

УДК: 615.811.1:612.128616-005.4:577.11/12:616-092.4

**В.З. Харченко, А.В. Кубышкин, Л.В. Анисимова,
Ю.И. Шрамко, А.А. Жукова**
**ПАТОГЕНЕТИЧЕСКОЕ ОБОСНОВАНИЕ СОЧЕТАННОГО ПРИМЕНЕНИЯ
ИНГИБИТОРОВ ПРОТЕИНАЗ И АНТИОКСИДАНТОВ ПРИ
ОСЛОЖНЕННОМ РЕПЕРFUЗИОННОМ СИНДРОМЕ**

ГУ «Крымский государственный медицинский университет им. С.П. Георгиевского»

Харченко В.З., Кубышкин А.В., Анисимова Л.В., Шрамко Ю.И., Жукова А.А. Патогенетическое обоснование сочетанного применения ингибиторов протеиназ и антиоксидантов при осложненном реперфузионном синдроме // Украинский морфологический альманах. – 2014. – Том 12, № 4. – С. 107-110.

В статье проведен анализ состояния протеиназ-ингибиторной и прооксидантно-антиоксидантной систем сыворотки крови у крыс с моделью реперфузионного синдрома, осложненного кровопотерей обосновано сочетанное применение антиоксидантов и ингибиторов протеиназ для его патогенетической коррекции. Установлено, что сочетанное применение антиоксиданта и ингибитора протеиназ для патогенетической коррекции реперфузионного синдрома, осложненного кровопотерей, способствует восстановлению нарушенного баланса протеиназ-ингибиторной и прооксидантно-антиоксидантной систем крови.

Ключевые слова: реперфузионный синдром, ингибиторы протеиназ, антиоксиданты.

Харченко В.З., Кубышкин А.В., Анисимова Л.В., Шрамко Ю.И., Жукова А.А. Патогенетичне обґрунтування поєднаного застосування інгібіторів протеїназ та антиоксидантів при ускладненому реперфузійному синдромі // Український морфологічний альманах. – 2014. – Том 12, № 4. – С.107-110.

У статті проведено аналіз стану протеїназ-інгібіторної і прооксидантно-антиоксидантної систем сироватки крові у щурів з моделлю реперфузійного синдрому, ускладненого крововтратою про обґрунтовано поєднане застосування антиоксидантів та інгібіторів протеїназ для його патогенетичної корекції. Встановлено, що поєднане застосування антиоксиданту і інгібітора протеїназ для патогенетичної корекції реперфузійного синдрому, ускладненого крововтратою, сприяє відновленню порушеного балансу протеїназ-інгібіторної і прооксидантно-антиоксидантної систем крові.

Ключові слова: реперфузійний синдром, інгібітори протеїназ, антиоксиданти.

Kharchenko V.Z., Kubishkin A.V., Anisimova L.V., Shramko Yu. I. Zhukova A.A. Pathogenetic basis of proteinases inhibitors' and antioxidants' combined application in the case of complicated reperfusion syndrome // Український морфологічний альманах. – 2014. – Том 12, № 4. – С. 107-110.

In the article the analysis of proteinase-inhibitors' and prooxidant-antioxidant systems of blood in the rats with the model of reperfusion syndrome complicated by bleeding was adduced. Combinative application of antioxidants and proteinases inhibitors for the pathogenetic therapy of reperfusion syndrome complicated by bleeding was substantiated. It was determined, that combinative application of antioxidants and proteinases inhibitors for the pathogenetic therapy of reperfusion syndrome complicated by bleeding promotes the restoration of the balance between proteinase-inhibitors' and prooxidant-antioxidant systems of blood.

Key words: reperfusion syndrome, proteinase inhibitors, antioxidants.

Введение. Около 15-25% пострадавших в катастрофах, при стихийных бедствиях получают травмы опорно-двигательного аппарата со сдавливанием мягких тканей [10]. При восстановлении кровообращения в ранее ишемизированных (более 2 часов) тканях возникает реперфузионный синдром (РС), характеризующийся крайне тяжелым течением, приводящем к развитию полиорганной недостаточности и летальному исходу [12]. При этом довольно часто возникают комбинированные поражения, в том числе сочетания реперфузионных нарушений с острой кровопотерей [10, 12]. Следовательно РС, осложненный кровопотерей, является патологическим состоянием, механизмы развития которого, объединяют патогенетические звенья как реперфузионного синдрома, так и острой кровопотери, что приводит к ранним системным нарушениям гемодинамики и следовательно более тяжелому течению. По данным литературы, нарушение баланса протеиназ-инги-

биторной и прооксидантно-антиоксидантной систем играет важную роль как в патогенезе РС, так и в развитии кровопотери [3, 4, 8]. В связи с этим основные принципы патогенетической терапии должны быть направлены на патогенетическую коррекцию свободно-радикального окисления и активацию протеолиза [8, 9].

Связь работы с научными программами, планами, темами. Работа является фрагментом научно-исследовательской работы кафедры общей и клинической патофизиологии Государственного Учреждения «Крымский государственный медицинский университет имени С.И. Георгиевского» «Разработка диагностических и прогностических критериев оценки развития воспаления, ассоциированного с различными заболеваниями» (№ государственной регистрации 0113U001557).

Цель исследования - изучить роль протеолитических и свободно-радикальных механизмов в развитии реперфузионного синдрома,

осложненного кровопотерей и обосновать сочтанный применение антиоксидантов и ингибиторов протениназ для его патогенетической коррекции.

Материалы и методы. Исследования были проведены на 69 белых крысах-самцах линии «Vistar» (массой 180-200 граммов). Острую кровопотерю вызывали с помощью забора крови из хвостовой вены из расчета 10 % от ОЦК. После острой кровопотери под легким эфирным наркозом накладывали резиновые жгуты на уровне паховой складки на обе задние конечности сроком 6 часов. Изучение эффективности экспериментальной коррекции с использованием ингибитора протениназ и антиоксиданта проводилось путем однократного внутривенного введения препаратов перед снятием жгутов. В качестве ингибитора протениназ применяли гордокс (aprotininum, Gedeon Richter, Венгрия) в дозе 20000 КИЕД/кг массы, разведенный в изотоническом растворе натрия хлорида, из расчета 10 мл/кг массы. В качестве антиоксиданта использовали корвитин, являющийся водорастворимой формой биофлавоноида кверцетина (ЗАО НПЦ «Борщаговский химико-фармацевтический завод», г. Киев), который вводили в дозе 10 мг/кг массы тела, разведенный в изотоническом растворе натрия хлорида, из расчета 10 мл/кг массы. Крысам контрольной группы вводили изотонический раствор натрия хлорида из расчета 10 мл/кг массы.

Забор биологического материала производили через 12 часов после реваккуляризации конечностей. Кровь для исследований получали путем декапитации наркотизированных крыс. Экспериментальные исследования проводились в соответствии с требованиями «Европейской конвенции о защите позвоночных животных, которые используются в исследовательских и других научных целях» (Strasburg, 18.03.1986).

Исследуемые животные были разделены на 6 групп: I группа – интактные животные (n=12), II

группа – РС без лечения, (n=10), III группа – РС осложненный кровопотерей (n=11), IV группа – РС осложненный кровопотерей + корвитин (n=12), V группа – РС осложненный кровопотерей + гордокс (n=12), VI группа – РС осложненный кровопотерей + корвитин + гордокс (n=12).

Активность протениназ и их ингибиторов исследовали с использованием энзиматических методов [5]. Так протеолитическую активность оценивали по уровню эластазоподобной активности (ЭПА) и трипсиноподобной активности (ТПА) сыворотки крови. Активности ингибиторов протениназ изучали по уровню антитриптической активности (АТА) и содержанию кислотостабильных ингибиторов (КСИ) сыворотки крови.

Показатели вторичных активных продуктов ПОА сыворотки крови изучали по количеству ТБК активных продуктов (ТБК-АП) [1]. Антиоксидантный потенциал крови оценивали по уровню каталазоподобной активности (КПА) [6], пероксидазоподобной активности (ППА), содержанию церулоплазмينا (ЦП) [11], активности супероксиддисмутазы (СОД) в сыворотке крови [2].

Статистическая обработка полученных данных проведена с применением методов вариационной статистики с вычислением средних величин (M), оценкой вероятности расхождений (m), оценкой достоверности изменений с использованием t-критерия Стьюдента. За достоверную принималась разность средних значений при $p < 0,05$.

Результаты исследования и их обсуждение. В ходе проведенных исследований было установлено, что развитие РС и РС, осложненного кровопотерей сопровождается ростом ТПА и падением ЭПА, АТА и КСИ сравнительно с аналогичными показателями интактных животных (табл.1).

Таблица 1. Динамика изменений протениназ-ингибиторной системы крови при РС, осложненном кровопотерей и при комбинированном лечении

Группы животных	Показатели			
	ТПА	ЭПА	АТА	КСИ
	Мк/Мл*мин		ИЕ/мл*мин	
I группа	0,37±0,05	2,48±0,15	39,3±2,54	11,4±0,14
II группа	0,56±0,05	0,89±0,03	22,4±1,98	3,03±0,50
III группа	0,62±0,07*	1,78±0,09**,**	13,8±1,53*	5,8±0,33*
IV группа	0,32±0,02**	1,84±0,09**,**	29,39±0,84**,**	6,99±0,63**,**
V группа	0,28±0,01**,**	1,36±0,13**,**	60,15±2,80**,**	10,55±0,88**,**
VI группа	0,26±0,06**,**	1,28±0,09**,**	63,42±4,90**,**	8,03±1,96**,**

Примечание: * $p < 0,05$, по сравнению с интактными животными; ** $p < 0,05$ по сравнению с группой без лечения

Причем более выраженное повышение активности трипсиноподобных протениназ сыворотки крови на 67,5 % и снижение уровня АТА на 64,9%, КСИ – на 49,2% по сравнению с контрольной группой наблюдалось при РС, осложненном кровопотерей. ТПА была 58,0 % ниже значений группы животных не получавшим ле-

чение и достоверно не отличался от показателя интактных крыс.

Также в данной группе был выявлен самый высокий уровень АТА, который превысил показатели контроля – на 61,5 %. Самый высокий уровень КСИ среди групп с ле-

чением также был отмечен в сыворотке крови крыс, которым вводили ингибитор протеиназ, при этом уровень КСИ превышал показатель группы без лечения на 82,2 % и достоверно не отличался от показателя интактных животных.

Патогенетическая коррекция РС, осложненного кровопотерей способствовала снижению ТПА и росту ингибиторов протеаз. При этом наиболее выраженное снижение ТПА было отмечено в сыворотке крови жи-

вотных, которым сочетано вводили антиоксиданты и ингибиторы протеиназ.

При исследовании прооксидантно-антиоксидантной системы у крыс с моделями РС и РС, осложненного кровопотерей происходило увеличение содержания ТБК-АП, которое сопровождалось снижением уровня как сывороточных антиоксидантов (перулоплазмин), так и внутриклеточных антиоксидантных ферментов (супероксиддисмутазы, каталазы, пероксидазы) по сравнению со здоровыми животными (табл. 2).

Таблица 2. Динамика изменений окислительно-антиоксидантной системы крови при РС, осложненном кровопотерей и при комбинированном лечении

Группы животных	Показатель				
	ТБК-АП нМ МДА/мл	ЦП мг/л	КПА мМ/гНб•с	ППА мМ/гНб	СОД Ед/мл*Нб
I группа	88,6±18,89	208,6±17,17	0,31±0,03	6,12±0,31	131,5±5,18
II группа	160,2±10,12	110,1±5,21 *	0,37±0,05	3,32±0,10	62,5±3,22
III группа	169,8±7,32 *	89,4±1,62 *	0,23±0,02 *	2,72±0,28*	47,9±7,09
IV группа	136,10±35,10	290,90±13,50*,**	0,28±0,01 **	7,36±0,79 **	186,85±10,88*,**
V группа	143,76±24,51	253,97±16,72*,**	0,43±0,02 **,*	4,08±0,19 **,*	156,75±32,67**,*
VI группа	130,45±14,56 **	280,88±16,04 **,*	0,39±0,01 **,*	5,10±0,23 **,*	414,26±5,83 **,*

Примечание: * $p < 0,05$, по сравнению с интактными животными; ** $p < 0,05$ по сравнению с группой без лечения

Наиболее выраженный рост содержания ТБК-АП в сыворотке крови на 91,7 % а также снижение ППА на 42,8%, СОД – на 63,5 % а ЦП – на 57,1 % по сравнению со здоровыми животными наблюдался при РС, осложненном кровопотерей. Использование антиоксиданта, ингибитора протеиназ и сочетанное их применение вызвало снижение ТБК-АП по сравнению с группой крыс без лечения. Самое низкое количество ТБК-АП наблюдалось в сыворотке крови крыс, которым вводили комбинацию препаратов. Так уровень изучаемого показателя был на 23,2 % ниже значений группы без лечения. При моделировании РС, осложненного кровопотерей, на фоне введения антиоксиданта, ингибитора протеиназ и сочетанного применения антиоксиданта и ингибитора протеиназ к 12-ти часам от начала исследований было выявлено значительное увеличение количества ЦП в сыворотке крови и составило в 2 раза больше по сравнению с группой без лечения, а повышение уровня данного фермента по сравнению с группой интактных животных было на 39,4 %, 21,7 % и 34,6 %, соответственно.

Патогенетическая коррекция реперфузионного синдрома сочетанным применением ингибитора протеиназ и антиоксиданта вызвала существенный рост СОД по сравнению с данным показателем крыс, которые не получали лечение. При этом в этой группе уровень СОД был выше значений группы без лечения в 9 раз и выше значений контрольной группы в 3 раза. Самый высокий уровень КПА в группах с патогенетической коррекцией РС, продолжительностью 12 часов, осложненного кровопотерей был выявлен в крови крыс которым вводился ингибитор протеиназ. В данной группе был отмечен рост изучаемого показателя на 86,9 % по срав-

нению с группой без лечения и на 38,7% по сравнению со значениями группы интактных животных. Через 12 часов после снятия жгутов в группе с моделью РС, осложненного кровопотерей, на фоне применения антиоксиданта было отмечено наиболее существенное повышение уровня ППА в 3 раза по сравнению с показателями группы без лечения.

Таким образом, в ходе экспериментальных исследований была установлена значительная роль в патогенезе РС и РС, осложненного кровопотерей активация протеиназ и свободнорадикального окисления на фоне истощения эндогенной антиоксидантной защиты и ингибиторного потенциала сыворотки крови. Сочетанное применение антиоксиданта и ингибитора протеиназ для патогенетической коррекции РС, осложненного кровопотерей, способствует восстановлению нарушенного баланса протеиназ-ингибиторной и прооксидантно-антиоксидантной систем крови. Причем наиболее выраженный эффект достигается при сочетанном использовании данных препаратов.

По-видимому, это связано с тем, что ингибитор протеиназ оказывает прямой эффект по увеличению ингибиторного потенциала. В свою очередь антиоксидант способствует защите ингибиторов протеиназ, активность которых снижается под действием активных форм кислорода, гиперпродукция которых возникает при окислительном стрессе, возникающем при РС.

Выводы:

1. Развитие реперфузионного синдрома и реперфузионного синдрома, осложненного кровопотерей, сопровождается выраженным дисбалансом протеиназ-ингибиторной и прооксидантно-антиоксидантной систем, играющих

ключевую роль в патогенезе реперфузионного синдрома осложненной кровопотерей.

2. Сочетанное применение антиоксиданта и ингибитора протеиназ для патогенетической коррекции реперфузионного синдрома, осложненного кровопотерей, способствует восстановлению баланса протеиназ-ингибиторной и прооксидантно-антиоксидантной систем сыворотки крови.

Перспективы дальнейших исследований.

Перспективным направлением данного исследования является изучение протеиназ-ингибиторной и прооксидантно-антиоксидантной систем на местном уровне при коррекции осложненного реперфузионного синдрома.

СПИСОК ИСПОЛЬЗОВАННОЙ ЛИТЕРАТУРЫ:

1. Гаврилов В.Б. Спектрофотометрическое определение содержания гидроперекисей липидов в плазме крови / В.Б. Гаврилов, М.И. Мешкорудая // *Лаб. Дело.* – 1983. - № 3. – С. 33-36
2. Дубинина Е.Е. Активность и изоферментный спектр супероксиддисмутазы эритроцитов и плазмы крови человека / Е.Е. Дубинина, Л.А. Сальникова, Л.Ф. Ефимова // *Лабораторное дело.* – 1983. - №10. – С. 30-33
3. Козиев М.П. Изменение основных биохимических показателей и механизмов адаптации при острой кровопотере / М.П. Козиев, С.М. Горбачева // *Сибирский медицинский журнал.* – 2009. – №7. – С. 76–78. 7
4. Лукьянова Л.Д. Энерготропное, антигипоксическое и антиоксидантное действие флавоноидов / Л.Д. Лукьянова, Э.А. Германова, А.И. Лыско // *Вестник Российской АМН.* – 2007. – № 2. – С. 55–63. 18
5. Маханова Р.С. К вопросу изучения перекисного окисления липидов / Р.С. Маханова // *Известия Оренбургского государственного аграрного университета.* – 2011. – Т.1, № 29-1. – С.231-234. 16
6. Метод определения активности каталазы / М.А. Королук, Л.И. Иванова, И.Б. Майорова [и др.] // *Лабораторное дело.* – 1988. - № 1. – С. 16-19.
7. Методи визначення активності неспецифічних протеїназ і їх інгібіторів у сироватці крові і біологічних рідинах (методичні рекомендації) / А.В. Кубишкін, В.З. Харченко, П.Ф. Семенець [та ін.] – Київ 2010 - 28 с.
8. Молекулярные механизмы развития экстремальных состояний и их коррекция / Харченко В.З., Кубышкин А.В., Фомочкина И.И. и др. - Симферополь: Доля, 2011. - 155 с.. 12
9. О возможных путях профилактики реперфузии при критических состояниях / Е.А. Соболева, Ю.П. Орлов // *Сибирский медицинский журнал.* - 2012. - № 1. – С. 13-16. 14
10. Попов А.С. Безаппаратный мембранный плазмаферез в комплексной терапии пострадавших с краш-синдромом на этапах эвакуации в условиях аэромобильного госпиталя МЧС России / А.С. Попов, С.П. Логинов, Н.А. Образцов // *Анестезиология и реаниматология.* – 2007. – № 4. – С.28–30. 10
11. Попов Т. Метод определения пероксидазной активности крови / Т. Попов, Л. Нейковская // *Гигиена и санитария.* – 1971. - №10. – С. 89-91
12. Makam P. BTK Stenting in Critical Limb Ischemia // *Endovascular Today.* – September, 2010. – P.69-72. 13

*Надійшла 16.04.2014 р.
Рецензент: проф. В.І. Лузін*